

RAPID DETECTION OF CLIFFORD BACTERIA

Best Available Copy

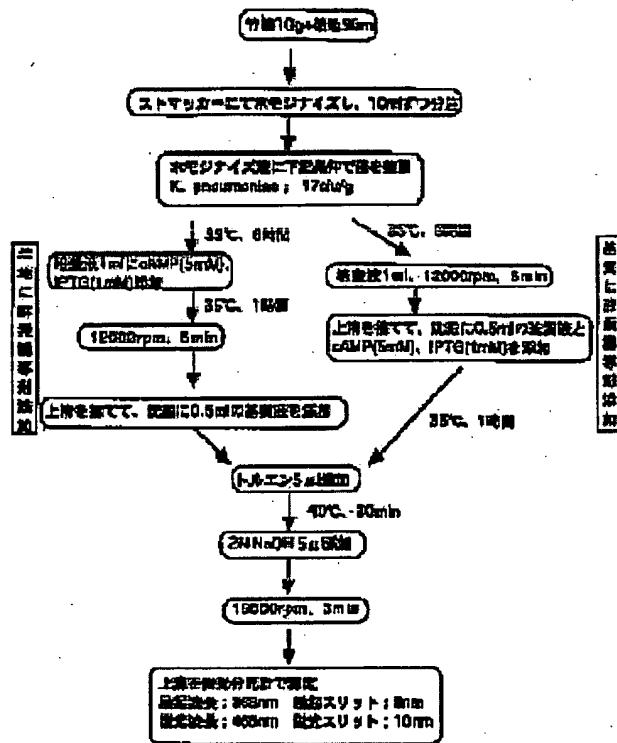
Patent number: JP2000093195
 Publication date: 2000-04-04
 Inventor: YAMADA SHOICHI; OHASHI EIJI
 Applicant: NIPPON SUISAN KAISHA LTD
 Classification:
 - international: C12Q1/10; C12Q1/34; C12Q1/48; C12Q1/10; C12R1/19;
 C12Q1/10; C12R1/22
 - european:
 Application number: JP19980270370 19980924
 Priority number(s): JP19980270370 19980924

[Report a data error here](#)

Abstract of JP2000093195

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for quickly and accurately judging the presence of coliform bacteria in a food, if required, the number of coliform bacteria.

SOLUTION: This method for detecting coliform bacteria by using β -galactosidase as an index and comprises culturing a specimen or a test solution containing a fixed amount of the specimen so as to increase the formed amount of β -galactosidase being a coliform bacteria specific enzyme and measuring the enzyme activity of β -galactosidase. In order to increase the formed amount of β -galactosidase, the specimen or the test solution is cultured in the presence of adenosine 3',5'-cyclic phosphate (cAMP) and/or hexokinase. Preferably the specimen or the test solution is cultured by also using a process for culture in the presence of isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) and/or by using a fluorescent substrate having excellent sensitivity to β -galactosidase as (5) a substrate, preferably 4-methylumbelliferyl- β -D-galactoside.



Data supplied from the sp@cenet database - Worldwide

B9

(51) Int.Cl.
 C 12 Q 1/10
 1/34
 1/48
 // (C 12 Q 1/10
 C 12 R 1:19)

識別記号

F I
 C 12 Q 1/10
 1/34
 1/48

マーク (参考)
 4 B 0 6 3

Z

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 8 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平10-270370

(22)出願日 平成10年9月24日 (1998.9.24)

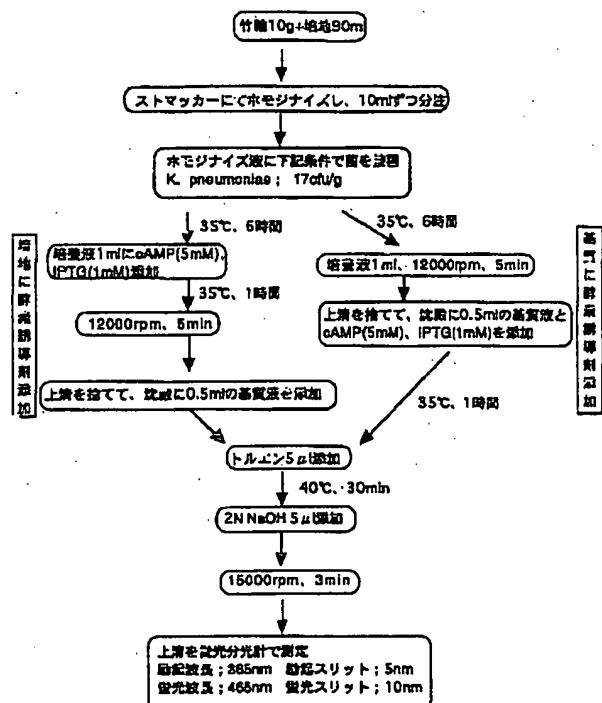
(71)出願人 000004189
 日本水産株式会社
 東京都千代田区大手町2丁目6番2号
 (72)発明者 山田 彰一
 八王子市北野町559-6 日本水産株式会社中央研究所内
 (72)発明者 大橋 英治
 八王子市北野町559-6 日本水産株式会社中央研究所内
 (74)代理人 100102314
 弁理士 須藤 阿佐子
 Fターム (参考) 4B063 QA01 QA18 QQ06 QQ35 QR07
 QR41 QR42 QR66 QS20 QX02

(54)【発明の名称】 大腸菌群の迅速検出法

(57)【要約】

【課題】 食品中の大腸菌群の有無を、必要によりその数を迅速に正確に判定する方法を提供すること。

【解決手段】 大腸菌群を該 β ガラクトシダーゼを指標に検出する方法であって、検体または該検体を一定量含む被検液を、大腸菌群特異的酵素である β ガラクトシダーゼの生成量が増大するように培養し、該 β ガラクトシダーゼの酵素活性を測定する。 β ガラクトシダーゼの生成量を増大させるため、アデノシン3', 5'サイクリックAMP (cAMP) および/またはヘキソキナーゼの存在下で培養する。イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノサイド (IPTG) の存在下で培養する、および/または(5)基質として β ガラクトシダーゼの感度の良い蛍光基質、好ましくは4-メチルウンベリフェリル- β -D-ガラクトシドを用いて培養する工程と併用することが好ましい。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 大腸菌群を該 β ガラクトシダーゼを指標に検出する方法であって、検体または該検体を一定量含む被検液を、大腸菌群特異的酵素である β ガラクトシダーゼの生成量が増大するように培養し、該 β ガラクトシダーゼの酵素活性を測定することを特徴とする大腸菌群の迅速検出法。

【請求項2】 アデノシン3', 5' サイクリックーリン酸(cAMP)および/またはグルコースを除去するための酵素の存在下で培養する請求項1の大腸菌群の迅速検出法。

【請求項3】 グルコースを除去するための酵素がヘキソキナーゼである請求項2の大腸菌群の迅速検出法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業の属する技術分野】 本発明は、大腸菌群の迅速検出法に関する。

【0002】

【従来の技術】 大腸菌群はBGLB培地において、酸とガスを生成する菌である。この酸やガスを測定する方法によると培養に48時間かかる。しかし、チルド流通している日配品のような比較的賞味期限の短い製品の場合、検査結果が出る前に製品は出荷されており、製品の安全性を確認することができず、その安全が危惧される。そのため迅速に大腸菌群を測定する方法が切望されている。大腸菌群を迅速に検出するには、大腸菌群特異的酵素である β ガラクトシダーゼの酵素活性を測定する方法、培養中の培地のインピーダンス変化を感知する方法、消費酸素や発生する二酸化炭素を測定する方法、菌体内のATPを利用して発光させる方法、PCRによる遺伝子增幅などが考えられる。しかし、大腸菌群の検出時間が8時間以内とした場合、いずれの方法も、検出系が確立されていないものか、確立されていてもこの時間内では十分な感度が得られないものかであるというのが現状である。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は食品中の大腸菌群の有無を、必要によりその数を迅速に正確に判定する方法を提供することを目的としている。

【0004】

【課題を解決するための手段】 対象物に大腸菌群が存在することを調べるためにあたり、大腸菌群の特異的酵素 β ガラクトシダーゼを指標にする。その β ガラクトシダーゼの生成量を増大させてからその酵素活性を測定する。すなわち、本発明は、大腸菌群を該 β ガラクトシダーゼを指標に検出する方法であって、検体または該検体を一定量含む被検液を、大腸菌群特異的酵素である β ガラクトシダーゼの生成量が増大するように培養し、該 β ガラクトシダーゼの酵素活性を測定することを特徴とする大腸菌群の迅速検出法を要旨としている。上記の β ガラクト

シダーゼの生成量が増大するように培養する手段として、以下の(a)および/または(b)手段が本出願前周知である。

(a) イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノサイド(IPTG)の存在下で培養する。

(b) 基質として β ガラクトシダーゼの感度の良い蛍光基質を用いて培養する。該蛍光基質として、好ましくは4-メチルウンベリフェリル- β -D-ガラクトシドを用いる。

【0005】 本発明は、 β ガラクトシダーゼの生成量が増大するように培養する手段が、以下の(1)および/または(2)の手段であることを特徴としている。

(1) アデノシン3', 5' サイクリックーリン酸(cAMP)の存在下で培養する。

(2) グルコースを除去するための酵素の存在下で培養する。

上記のグルコースを除去するための酵素の好ましい例として、ヘキソキナーゼを挙げることができる。

【0006】 したがって、本発明の大腸菌群の迅速検出法は、大腸菌群を該 β ガラクトシダーゼを指標に検出する方法であって、検体または該検体を一定量含む被検液を、以下に示した(a)の手段、(b)の手段、ならびに、(1)および/または(2)の手段で大腸菌群特異的酵素である β ガラクトシダーゼの生成量が増大するように培養し、該 β ガラクトシダーゼの酵素活性を測定する態様を包含している。

(a) イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノサイド(IPTG)の存在下で培養する。

(b) 基質として β ガラクトシダーゼの感度の良い蛍光基質を用いて培養する。該蛍光基質として、好ましくは4-メチルウンベリフェリル- β -D-ガラクトシドを用いる。

(1) アデノシン3', 5' サイクリックーリン酸(cAMP)および/または(2)グルコースを除去するための酵素の存在下で培養する。

【0007】

【発明の実施の形態】 本発明の大腸菌群の迅速検出法において、検体または該検体を一定量含む被検液を、大腸菌群特異的酵素である β ガラクトシダーゼの生成量が増大するように培養するとき、例えば基質として β ガラクトシダーゼの感度の良い蛍光基質、好ましくは4-メチルウンベリフェリル- β -D-ガラクトシドを用いる。 β ガラクトシダーゼの生成量をあげるために、イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノサイド(IPTG)を使用する。さらに β ガラクトシダーゼの生成量をあげるために、アデノシン3', 5' サイクリックーリン酸(cAMP)および/または反応液中のグルコースを除去するための酵素、好ましくはヘキソキナーゼを使用する。グルコースを除去するための酵素としては、他にグルコースオキシダーゼ、グルコースデヒドロゲナーゼ等

が挙げられる。

【0008】食品中の大腸菌群の有無を8時間以内で判定するため、大腸菌群特異的酵素である β ガラクトシダーゼの酵素活性を指標とした。 β ガラクトシダーゼの基質として種々の合成誘導体が知られているが、最も感度がよいとされている蛍光基質、なかでも蛍光強度が強い4-メチルウンペルフェリル- β -D-ガラクトシドを用いた。この基質を用いた方法（特公昭58-17598号）は存在するが、その方法では食品1g中に1cfuといったごく少量の大腸菌群しか存在しない場合、8時間以内の検出は困難である。

【0009】そのため、大腸菌群の β ガラクトシダーゼ生成量を増大させることで検出感度を上げることを試みた。既に上記方法にも示されているイソプロピル- β -D-チオガラクトピラノサイド(IPTG)とアデノシン3'、5'サイクリックアミノ酸(cAMP)とヘキソキナーゼを添加することによって、相乗的に β ガラクトシダーゼの生成量を増大することができた。ヘキソキナーゼの添加効果についてはまだ報告がされていない。

【0010】本発明の検出法が対象とする大腸菌群：グラム陰性の桿菌で乳糖を分解し酸とガスを産生する微生物であり、例えば、エシェリア属、サイトロバクター属、クレブシエラ属、エンテロバクター属等があげられる。

使用する培地：大腸菌群のみが増殖できる何らかの選択圧をかけた培地が好ましい。

酵素誘導剤の添加量：IPTG 0.1 mM~10m

1) 使用した培地

ポリペプトン	
NaCl	
酵母エキス	
K ₂ HPO ₄	
SDS	
KNO ₃	
ピルビン酸ナトリウム	

2) 基質液

12.5 mg 4-メチルウンペルフェリル- β -D-ガラクトシド/50 ml H₂Oを加熱溶解後、0.5 M Tris-HCl (pH 9.0)を0.4 ml加え、陰イオン交換カラムを通してHClでpHを7.2に調整後0.45 μ mのフィルターでろ過。この液を9に対して1の割合で0.5 MのPIPES (pH 7.2)を加え基質液とする。

3) 蛍光値の陽性、陰性の判定

菌が存在していないときの蛍光値は10~15、蛍光値が20以上であったとき陽性とした。20未満のときは陰性とした。

【0015】実験1：cAMP、IPTG、ヘキソキナーゼの添加効果

図1に示す手順で、竹輪10gと培地90mlをストマ

M、cAMP 0.1 mM~100 mM、ヘキソキナーゼ 0.01 U~5 U

【0011】感度の良い蛍光基質：4-メチルウンペルフェリル- β -D-ガラクトシド、3-カルボキシ-ウンペルフェリル- β -D-ガラクトシド、フルオレジン-ダイ- β -D-ガラクトシド、C₁₂-フルオレジン-ダイ- β -D-ガラクトシド

【0012】

【作用】本発明ではIPTG、cAMP、ヘキソキナーゼの添加によって大腸菌群の β ガラクトシダーゼの生成量を増大させることができ、8時間での検出が可能となる。それぞれの役割はIPTGが β ガラクトシダーゼ遺伝子の転写をONにし、cAMPは転写因子と結合してその転写を促進する。ヘキソキナーゼはグルコースをグルコース-6-リン酸にする酵素である。グルコースが存在すると β ガラクトシダーゼの生成が阻害されるため、反応液中からグルコースをなくすために添加する。

【0013】

【実施例】本願発明の詳細を実施例で説明する。本願発明はこれら実施例によって何ら限定されるものではない。

【0014】実施例1

代表的な大腸菌群である大腸菌とクレブシエラニューモニア(Klebsiella pneumoniae)を用いて、 β -ガラクトシダーゼ生成量に影響を及ぼすcAMP、IPTG、ヘキソキナーゼの相乗効果およびその添加時期による影響についての検討。

15 g (培地1リットルあたり)

5 g	
5 g	
2.5 g	
0.1 g	
1 g	
1 g	

ッカにてホモジナイズし、10 mlずつ分注し、該ホモジナイズ液に菌(大腸菌12 cfu/g、K. pneumoniae 22 cfu/g)を接種し、35°C、6時間培養する。培養液を12000 rpmで5分間遠心分離して上清を捨てて、沈殿に5 mlの基質液を添加し、よく攪拌後、0.5 mlずつ分注し、各々の酵素誘導剤を添加し、35°C、1時間反応を行い、さらにトルエン5 μ lを添加し、40°C、30分間反応を行った。この反応液に2NのNaOH 5 μ lを添加し、12000 rpmで5分間遠心分離してから、365 nmの励起波長、5 nmの励起スリットで紫外線を照射して励起させ、465 nmの蛍光波長、10 nmの蛍光スリットの蛍光を蛍光分光計で測定する。大腸菌を添加した場合の結果を表1に、Klebsiella pneumoniaeを添加した場合の結果を表2に、それぞれ示す。

【0016】

【表1】

大腸菌を添加した場合			
cAMP 5 mM	IPTG 1 mM	ヘキソキナーゼ 0.3U	蛍光値
-	-	-	12
+	-	-	12
-	+	-	220
-	-	+	11
+	+	-	655
-	+	+	319
+	-	+	21
+	+	+	440

【0017】

【表2】

K. pneumoniae を添加した場合			
cAMP 10 mM	IPTG 1 mM	ヘキソキナーゼ 0.3U	蛍光値
-	-	-	12
+	-	-	13
-	+	-	16
-	-	+	12
+	+	-	22
-	+	+	19
+	-	+	13
+	+	+	31

【0018】実験2:cAMP、IPTGの添加時期
 図2に示すとおり、竹輪10gと培地90m1をストマッカーにてホモジナイズし、10m1ずつ分注し、該ホモジナイズ液に菌 (K. pneumoniae 17cfu/g) を接種し、35°C、6時間培養する。一方の培養液1m1を12000rpmで5分間遠心分離して上清を捨てて、沈殿に0.5m1の基質液とcAMP(5mM)、IPTG(1mM)を添加し、他方の培養液1m1にcAMP(5mM)、IPTG(1mM)を添加し、35°C、1時間培養してから12000rpmで5

分間遠心分離して上清を捨てて、沈殿に0.5m1の基質液を添加し、両者ともそれぞれトルエン5μlを添加し、40°C、30分間反応を行った。この反応液それぞれに2NのNaOH5μlを添加し、15000rpmで3分間遠心分離してから、365nmの励起波長、55nmの励起スリットで紫外線を照射して励起させ、465nmの蛍光波長、10nmの蛍光スリットの蛍光を蛍光分光計で測定する。結果を表3に示す。

【0019】

【表3】

	蛍光値 (培地に 酵素誘導剤添加)		蛍光値 (基質に 酵素誘導剤添加)	
	初発 (cfu/g)			
Klebsiella pneumoniae	17		15	32

【0020】結果

表1、表2より大腸菌、クレブシエラ ニューモニアに

おいてcAMP、IPTG、ヘキソキナーゼの併用効果が確認された。また、表3よりこれらの酵素誘導剤は基

質液に直接添加する方が好ましいことが示された。

【0021】実施例2

図3に示す手順で、大腸菌、*Klebsiella pneumoniae*を竹輪破碎物に加え、蛍光値を測定する。酵素誘導剤の添加量は、大腸菌の場合、cAMP 10 mM、IPTG 1

mM、ヘキソキナーゼ2Uであり、*K. pneumoniae*の場合、cAMP 10 mM、IPTG 1 mM、ヘキソキナーゼ0.2Uである。結果を表4に示す。

【0022】

【表4】

	初発 (cfu/g)	蛍光値
大腸菌	1	27
	10	506
<i>K. pneumoniae</i>	2	25
	20	167

【0023】実施例3

図3に示す手順で、種々の大腸菌群を竹輪破碎物に加え、蛍光値を測定する。対象菌は日本で市販されている

大腸菌群を用いた。結果を表5に示す。

【0024】

【表5】

	初発 (cfu/g)	蛍光値	酵素誘導剤 の条件
<i>Citrobacter freundii</i>	IFO12681	7	2
<i>Enterobacter arugen</i>	IFO13534	2	1
<i>Enterobacter gergoviae</i>	JCM1234	1	2
<i>Enterobacter intermedium</i>	JCM1238	1	2
<i>Citrobacter diversus</i>	JCM1659	1	2
<i>Budvicia aquatica</i>	JCM3902	1	1
<i>Ewingella americana</i>	JCM5911	1	2
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	IFO13547	2	2
<i>Enterobacter sakazakii</i>	JCM1233	1	2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	JCM1665	2	2
<i>Leclercia adecarboxylate</i>	JCM1667	1	2
<i>Klebsiella terrigena</i>	JCM1687	1	1
<i>Escherichia vulneris</i>	JCM1688	1	2
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	JCM6096	1	2

酵素誘導剤の条件：

1 : cAMP 10 mM, IPTG 1 mM, ヘキソキナーゼ2U

2 : cAMP 10 mM, IPTG 1 mM, ヘキソキナーゼ0.2U

【0025】

【発明の効果】食品中の大腸菌群の有無を、必要によりその数を迅速に正確に判定することができる。8時間での検出が可能となり、チルド流通している日配品のような比較的賞味期限の短い製品の大腸菌などの早期発見と

早期対応等が可能となる。

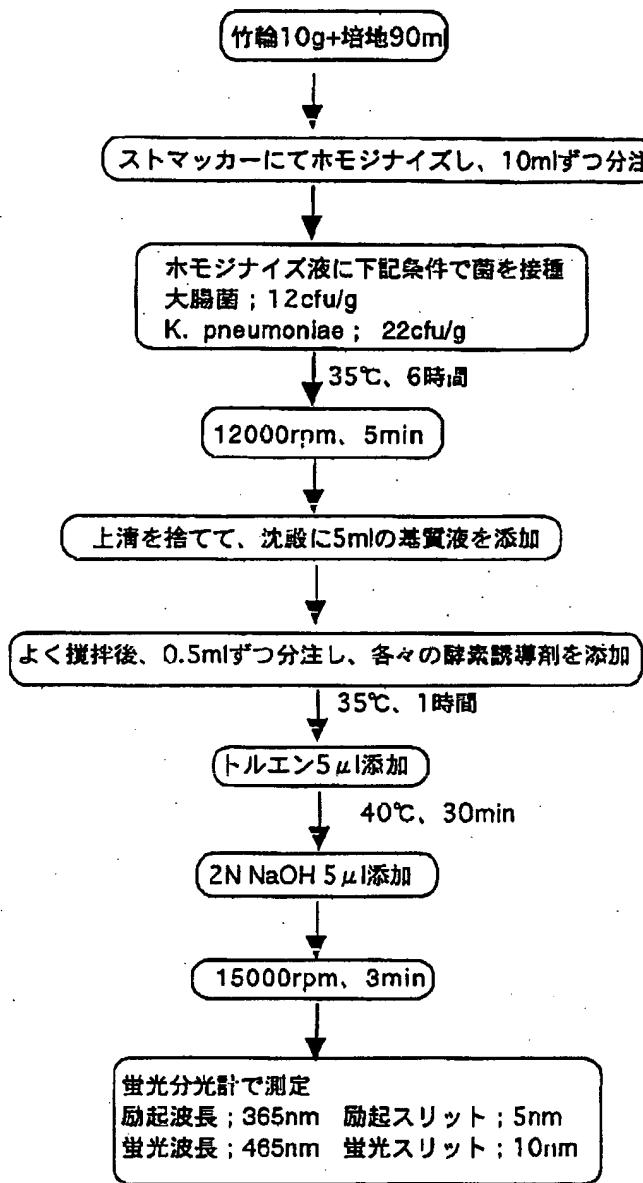
【図面の簡単な説明】

【図1】酵素誘導剤を添加して培養した後でβ-ガラクトシダーゼの酵素活性を測定する操作手順を説明する工程図である。

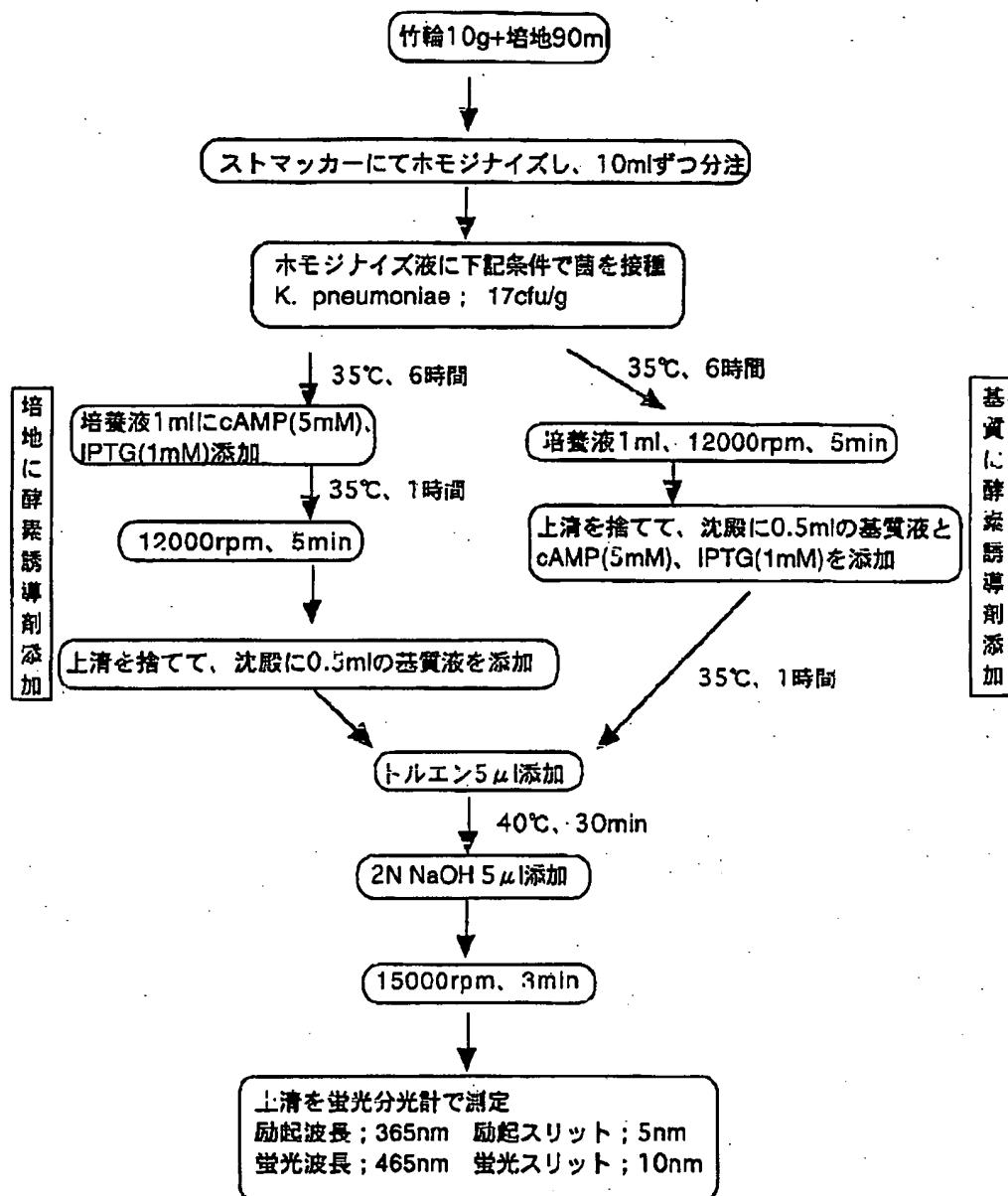
【図2】図1における*K. pneumoniae*を用いる場合の酵素誘導剤の添加の順序を変えたときの工程図である。

【図3】大腸菌、*Klebsiella pneumoniae*および種々の大腸菌群を竹輪破碎物に加え、蛍光値を測定するときの操作手順を説明する工程図である。

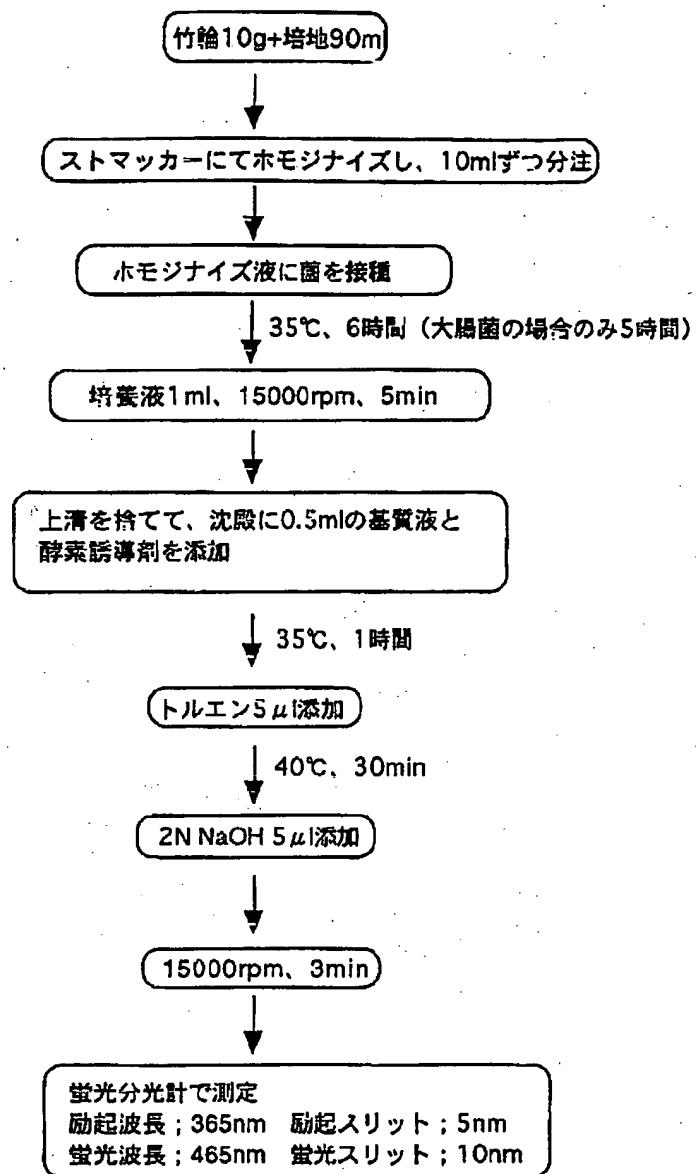
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.7

識別記号

F I

(参考)

(C 1 2 Q 1/10
C 1 2 R 1:22)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADING TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.